



Universidade Federal de Santa Catarina

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE STIRILPIRONAS E  
CUMARINAS DE *Polygala Sabulosa* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANSIOLÍTICA**

**ALUNA: JULIANA BASTOS  
ORIENTADOR: MOACIR GERALDO PIZZOLATTI**

**Relatório final referente  
à disciplina QMC 5510**

**FLORIANÓPOLIS, JANEIRO DE 2004.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE STIRILPIRONAS E  
CUMARINAS DE *POLYGALA* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANSIOLÍTICA

ALUNA: JULIANA BASTOS

Relatório final referente  
à disciplina QMC 5510

FLORIANÓPOLIS, JANEIRO DE 2004.

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Moacir Pizzolatti, pela grande oportunidade, orientação e incentivo.

À professora Tereza Cristina Monteiro e Felipe Duarte do laboratório de Farmacologia da UFSC pelos trabalhos realizados.

À todos os colegas do LQPN que me acompanharam durante a realização do meu trabalho que são: Anildo C. Júnior, Luis Verdi, prof<sup>a</sup> Inês B., Priscila de Bem, Danieli Kreuch, Karina, Gilberto da Luz, Fabiana , Fernanda, Christian, Heros, Wagner e Okima.

Aos meus queridos pais e meu irmão, pelo amor, incentivo e pelo apoio em todos os momentos da minha vida!

Ao meu namorado Eduardo, pelo amor e compreensão!!  
Dedico este trabalho a todos vocês por me ajudar a cumprir mais esta etapa de minha vida!!

Juliana Bastos

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
1.0 RESUMO.....	06
2.0 INTRODUÇÃO.....	07
2.1 CONSTITUINTES DE <i>P. sabulosa</i> .....	08
2.2 ESTIRILPIRONAS.....	10
2.3 CUMARINAS.....	11
2.4 ATIVIDADE ANSIOLÍTICA.....	12
3.0 OBJETIVOS.....	14
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1 Preparação e fracionamento dos extratos da planta.....	15
5.0 ENSAIOS DE ATIVIDADE.....	16
6.0 TRANSFORMAÇÕES ESTRUTURAIS.....	17
7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
8.0 CONCLUSÃO.....	24
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
10.0 ANEXOS.....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Constituintes de <i>P. sabulosa</i> .....	07
Figura 2 - Biossíntese de estilipironas .....	10
Figura 3 – Biossíntese de cumarinas.....	11
Figura 4 – Estrutura das kavalactonas.....	13
Figura 5 – Espectro de próton da fração 37-47.....	29
Figura 6 – Cromatograma CGAR da fração F1 37-47.....	29
Figura 7 – Espectro de próton da fração F2 9-11.....	30
Figura 8 – Cromatograma CGAR da fração F2 9-11.....	30
Figura 9 – Espectro de próton da escopoletina.....	31
Figura 10 – Espectro de IV da escopoletina.....	31
Figura 11 – Espectro de próton da acetóxi escopoletina.....	32
Figura 12 – Espectro de IV da benzoilóxi escopoletina.....	32
Figura 13– Espectro de carbono da acetóxi escopoletina.....	33
Figura 14 – DEPT da acetóxi escopoletina.....	33
Figura 15 – CGAR da mistura de padrões de estilipironas.....	34

## RESUMO

No presente trabalho, a reinvestigação fitoquímica da espécie *P. sabulosa* nos mostra a identificação e caracterização de estirilpironas, protohipericina e escopoletina, esta última inédita para a espécie. As estirilpironas possuem um esqueleto estrutural muito semelhante às kavalactonas de Kava-Kava, planta esta com importante atividade ansiolítica e antidepressiva e que já é comercializada como fitoterápico.

O extrato bruto hidroalcoólico de *P. sabulosa* foi prefracionado por extração com os solventes, hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração clorofórmica foi cromatografada em coluna de sílica gel e as frações contendo estirilpironas e cumarinas foram recromatografadas em coluna de sílica flash e purificadas por recristalização. De uma segunda coluna da fração clorofórmica foi isolada a protohipericina. A identificação destes compostos foi realizada através de análises espectroscópicas de RMN (ressonância magnética nuclear) e pelos tempos de retenção em CG (cromatografia gasosa) comparadas com padrões.

As estirilpironas foram submetidas a bioensaios de atividade ansiolítica no modelo do labirinto de cruz elevado. Como resultado, as estirilpironas promoveram um efeito do tipo ansiolítico na dose de 500 mg/Kg, com efeito similar ao apresentado pelos animais tratados com diazepam 0,75mg/Kg i.p. quando comparados com o grupo controle.

## 1.0 INTRODUÇÃO

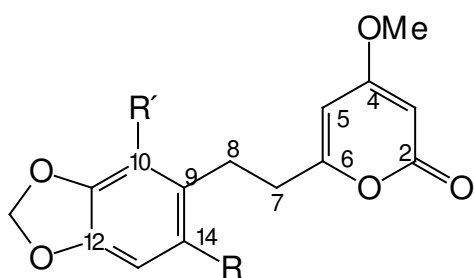
As espécies do gênero *Polygala* são ervas, subarbustos e raras vezes árvores com folhas normalmente alternas e ocasionalmente opostas ou verticiladas, flores brancas, esverdeadas, cor de rosa ou roxas, hermafroditas e zigomorfas, frutos capsulares, drupáceos ou samaróides e sementes com corpo glabro, pubérulo e globoso. A espécie aqui estudada, *Polygala sabulosa*, popularmente chamada de timuto-pinheirinho, desenvolve-se no Planalto Meridional Sul catarinense e tem sido utilizada na medicina popular como anestésico local e expectorante. O extrato bruto da planta toda e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila de *Polygala sabulosa* apresentam atividade tripanomicida com DL<sub>50</sub> de 5, 1, 5 e 10 µg/ml respectivamente. O estudo fitoquímico de *P. sabulosa* levou ao isolamento e identificação de dihidroestirilpironas de 1 a 3, estirilpironas 4 e 5, prenilcumarina 7 e protohipericina 8. (figura 1)<sup>(1)</sup>.

Os compostos que mais chamam a atenção foram as estirilpironas por apresentarem uma estrutura similar às kavalactonas, compostos estes com comprovada atividade ansiolítica. Este fato despertou o interesse no isolamento destes compostos e na reavaliação fitoquímica de novas amostras de *P. sabulosa* no sentido de verificar a ocorrência de estirilpironas.

### 1.1 Constituintes químicos e atividades biológicas de algumas espécies do gênero *Polygala*

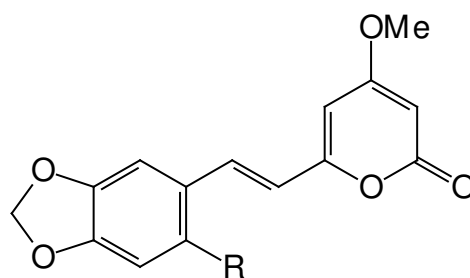
Estudos fitoquímicos realizados nos últimos anos revelam a presença de vários metabólitos em espécies de *Polygala*. A tabela 1 mostra algumas espécies com seus respectivos metabólitos e atividade biológica. Contudo, as xantonas são os metabólitos secundários mais freqüentemente encontrados e por isso são considerados os marcadores quimiotaxômicos do gênero.

No entanto, em *P. sabulosa*, não foi detectado a presença de xantonas, no entanto observou-se o acúmulo de estirilpironas, metabólito biossintetizado a partir do mesmo intermediário da biossíntese das xantonas. <sup>(2)</sup>



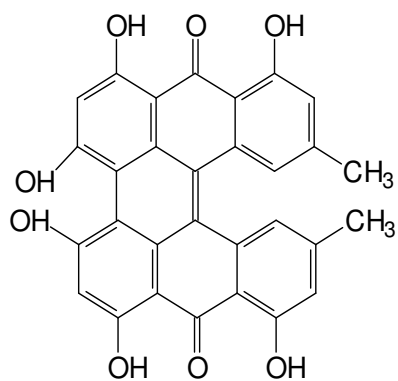
dihidroestirilpironas

	<b>R</b>	<b>R'</b>
1	H	H
2	OMe	H
3	OMe	OMe

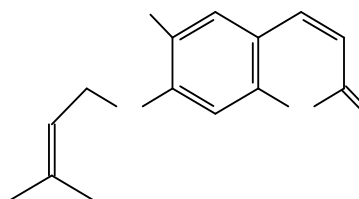


estirilpironas

	<b>R</b>
4	OMe
5	H



protohipericina

**Figura 1: Constituintes químicos isolados de *P. sabulosa***

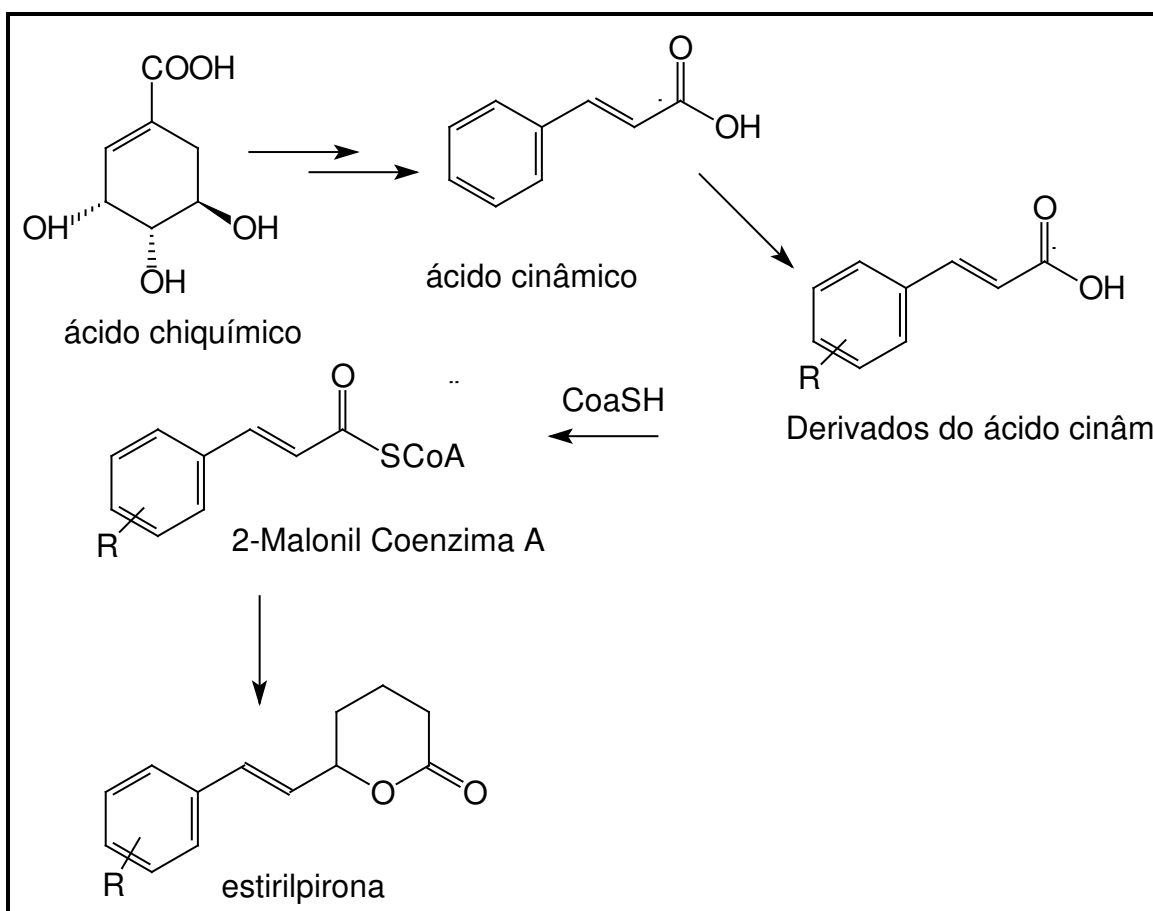


**Tabela 1** – Constituintes químicos e atividade biológica de espécies do gênero

ESPÉCIE	CONSTITUINTES	ATIVIDADE	REF.
<i>P. chinenses</i>	Lignana lactona, flavonóide glicosilado, lignana aril naftalida	-	3,20, 21, 22
<i>P. caudata</i>	Xantonas		7
<i>P. chamaebuxus</i>	Ésteres de ácido hidroxicinâmico	-	17
<i>P. cyparissias</i>	Xantonas	Atividade antinociceptiva e tripanomicida	9, 11, 1
<i>P. fallax</i>	Poliéster oligossacarídeo	-	12
<i>P. glomerata</i>	Polygalasaponinas, poliéster oligossacarídeo	-	10
<i>P. japonica</i>	kaempferol	-	13
<i>P. paniculata</i>	Xantonas, cumarinas	Atividade tripanomicida	28
<i>P. sabulosa</i>	Stiril e dihidrostirilpirona, flavonóides, cumarinas	Atividade tripanomicida	1, 28
<i>P. senega</i>	Saponinas, éster hdroxicinamiol	Aumento da resposta imune específica	23, 6
<i>P. tenuifolia</i>	Xantonas, onjisaponinas, derivados do ácido cinâmico	Gripe, difteria, coqueluxe, tétano, potencial antipsicótico, inibe secreção de necrose de tumor	4, 5,15, 19
<i>P. trphylla</i>	Xantonas	-	18
<i>P. virgata</i>	Ésteres de ácido sinápico, xantonas e isoflavonas	-	14, 16

## 1.2 Estirilpironas

As estirilpironas são definidas como um conjunto de metabólitos secundários que apresentam estruturas moleculares contendo um anel  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\zeta$ -lactona conectado a um fragmento estiril ou pseudo-estiril. Estudos de biossíntese demonstram que as estirilpironas são produzidos através da via do ácido chiquímico. <sup>(27)</sup>.



**Figura 2 - Esquema simplificado da biossíntese de estirilpironas<sup>29</sup>.**

### 1.3 Cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais mas também são encontrados em fungos e bactérias. Foram também bastante utilizadas como aromatizantes em alimentos, hoje em dia a sua utilização é considerada como adulteração devido a sua toxicidade. Algumas cumarinas apresentam atividade antiespasmódica, como é o caso da escopoletina que isolamos de *P. sabulosa* no presente trabalho<sup>(24)</sup>. Estruturalmente as cumarinas originam-se do ácido cinâmico, como segue a figura 3 abaixo:

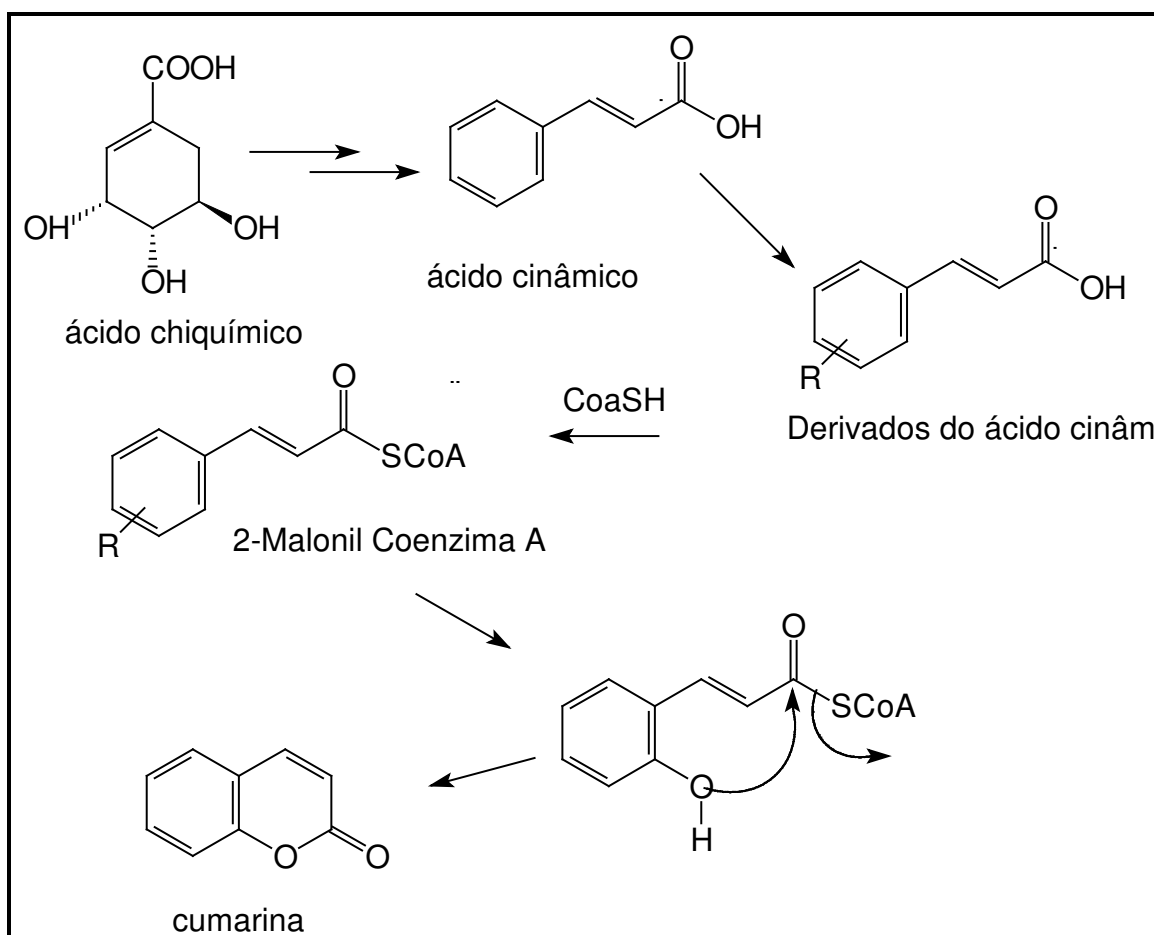


Figura 3 – Esquema simplificado da biossíntese de cumarinas<sup>29</sup>

#### 1.4 Atividade Ansiolítica

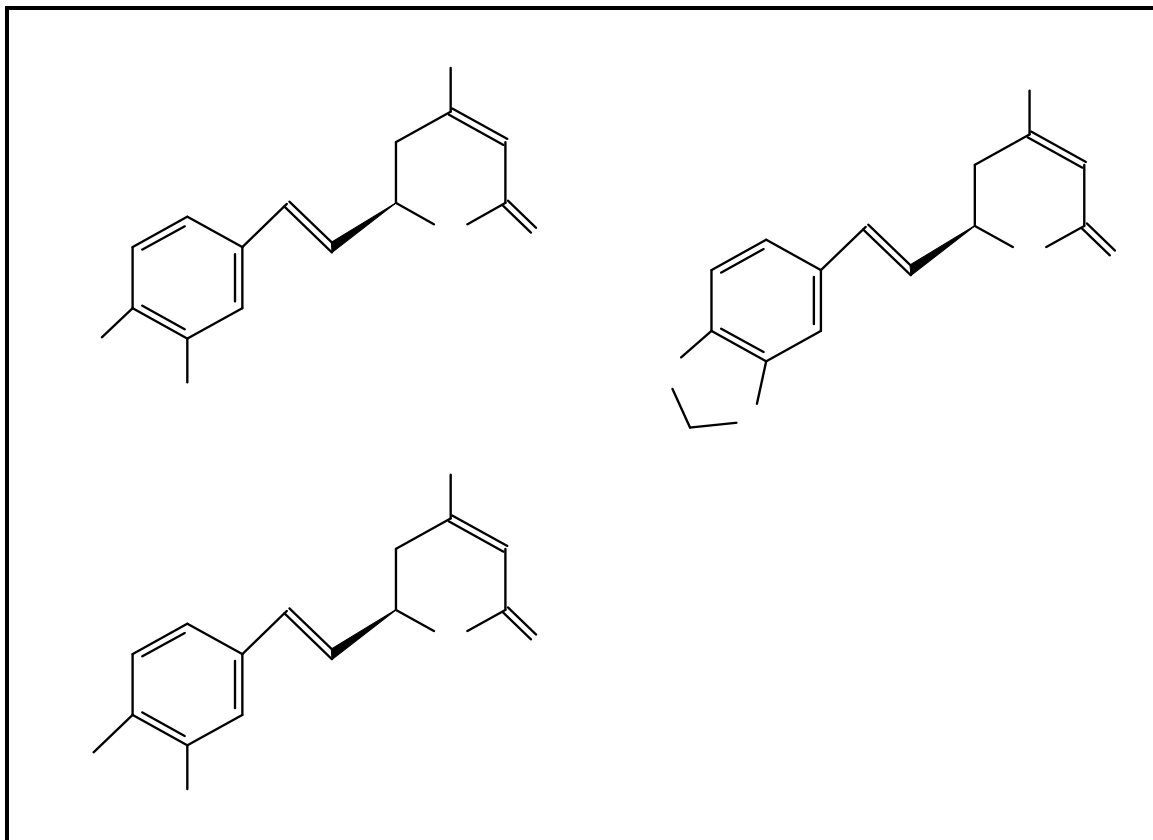
Em termos mais biológicos, a ansiedade pode ser considerada como uma forma particular de inibição do comportamento que ocorre em resposta a eventos ambientais que são novos, não compensadores ou punitivos. Os ansiolíticos podem ser chamados de hipnóticos, sedativos e tranqüilizantes menores. Alguns exemplos de sedativos ansiolíticos são: barbitúricos, benzodiazepínicos e etanol; essas drogas causam sono e diminuem a ansiedade. <sup>(25)</sup>

Algumas plantas, tais como passiflora, iverico, valeriana e kava-kava, que possuem este mesmo efeito, são utilizadas como remédios ansiolíticos naturais e entram na composição de vários fitoterápicos.

A Kava-Kava (*Piper methysticum*) é uma planta da família das Piperáceas, cujos extratos obtidos a partir da raiz seca são comercializadas de diversas formas. Tais extratos contem como princípio ativo as kavalactonas, que podem estar presentes a uma concentração de até 30%.

Nos últimos anos, a kava-kava tem sido destacada como uma planta de grande utilidade no tratamento de problemas como angústia nervosa, estados de tensão, agitação, ansiedade e insônia. Estudos farmacológicos demonstram que os princípios ativos da kava-kava – as kavalactonas (dentre as principais, a kavaína, metisticina e yangonina) (Fig. 4) – promovem um efeito relaxante nos músculos, particularmente útil em estados de tensão.

Estes componentes são os responsáveis pela eficácia de kava-kava como eficiente ansiolítico natural, muito menos sedativo que os tradicionais benzodiazepínicos (como Valium, Lexotan, etc., além de não produzir sonolência). Este novo ansiolítico pode ainda ser indicado em estados de estresse, fadiga, fraqueza, cefaléia e também como leve relaxante muscular, entre outros. <sup>(26)</sup>



**Figura 4 – Estruturas das kavalactonas de Kava-Kava**

## 2.0 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo:

- Reinvestigação fitoquímica de *P. sabulosa* voltada ao isolamento de estirilpironas;
- Avaliação da atividade ansiolítica em extrato bruto de *P. sabulosa*;
- Avaliar a presença de estirilpironas em diferentes amostras de *P. sabulosa*.
- Avaliar o poder analgésico da acetóxi escopoletina e benzoilóxi escopoletina.

### 3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Solventes: hexano, acetato de etila, etanol, clorofórmio, metanol e acetona. Os solventes utilizados foram de grau analítico da Merck. Para os fracionamentos cromatográficos utilizou-se sílica gel 0,063 – 0,2mm, e 0,04-0,063 de Merck. Para as cromatografias em camada delgada utilizou-se cromatoplasas de sílica gel 60 GF da Merck. Reveladores para cromatografia: iodo, solução reagente de anisaldeído sulfúrico e solução reagente de sulfato de cério.

Vidrarias e equipamentos: evaporador rotatório, balança analítica, estufa de aquecimento, chapa com agitação para aquecimento, colunas de vidro para cromatografia, pipetas graduadas, funis de separação, kitsatos, béqueres, erlenmeyers, suporte universal, garras, cubas cromatográficas, espátulas e pinças

Equipamentos analíticos:

- RMN  $H^1$ : os espectros foram obtidos a 200 MHz em um espectrômetro Brucker AC-200;
- RMN  $C^{13}$ : os espectros foram obtidos a 50 MHz e 75MHz em espectrômetros Brucker AC-200 F e Varian Gemini 300, respectivamente;
- CG: os cromatogramas foram obtidos em um SHIMADZU GC 14-b
- IV: os espectros obtidos no infra-vermelho entre 4000 e 400 $cm^{-1}$ , foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT16PC utilizando-se pastilhas compactas de KBr.

### 3.1 PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DA PLANTA

Amostras de *P. sabulosa* foram coletadas no município de Rancho Queimado (Planalto Meridional catarinense) e foi macerada durante 38 dias a temperatura ambiente com álcool etílico 95%. O extrato bruto obtido foi filtrado e concentrado utilizando-se um evaporador rotatório sob pressão reduzida, fornecendo um extrato bruto hidroalcoólico seco.

Após concentrado, o EB foi submetido a um pré-fracionamento em coluna cromatográfica utilizando solventes de distintas polaridades onde obteve-se os sub-

extratos hexano, clorofórmio e acetato de etila. O sub-extrato acetato de etila (coluna B) foi submetido a sucessivas cromatografias em coluna sobre sílica gel no modo gradiente de polaridade. As frações obtidas foram analisadas por CCF a qual originou a reunião das frações em grupos conforme seus respectivos fatores de retenção ( $R_f$ 's).

O sub-extrato clorofórmio (coluna A) foi submetido a uma cromatografia em coluna de sílica gel e foi eluída com um sistema de solventes hexano/acetato de etila/etanol em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 56 frações as quais foram reunidas em grupos após análises por cromatografia em camada delgada (CCD), conforme seus respectivos fatores de retenção ( $R_f$ 's). As frações 29,30 e 31 da coluna A estavam impuras, por isso foram reunidas e submetidas a uma recromatografia em coluna de sílica mais fina 0,02-0,063mm (coluna Flash 1), usando a técnica descrita para cromatografia relâmpago, sendo que esta técnica opera à fluxo e pressão constantes chamada cromatografia flash. As frações de 37 à 47 foram reunidas, purificadas e feito análise cromatográfica. Para estas frações foram obtidos os espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e os cromatogramas em CG. Uma segunda coluna flash (coluna Flash 2 ) foi preparada com as frações das águas mãe de 32 a 38 da coluna A . Como resultado desta separação obtivemos os compostos das frações 9 a 11 , 12 a 20 e 21 a 33 que foram reunidas, purificadas e foram obtidos os espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e os cromatogramas em CG. Das duas colunas flash foram isoladas as estirilpironas, sendo que da fração 21-33 isolou-se cumarina escopoletina.

A protohipericina foi isolada de uma segunda coluna feita da fração clorofórmica (coluna A1) sendo apenas a fração 28.

#### **4.0 ENSAIOS DE ATIVIDADE COM ESTIRILPIRONAS**

O bioensaio para atividade utilizou-se o método do labirinto de cruz elevado ("plus-maze"). Após tratamento, os animais (camundongos) são colocados individualmente em uma arena por 5 min e transferidos para o labirinto. O registro comportamental é feito através das frequências de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e nos fechados do labirinto, calculando-se a frequência de entradas nos braços abertos em



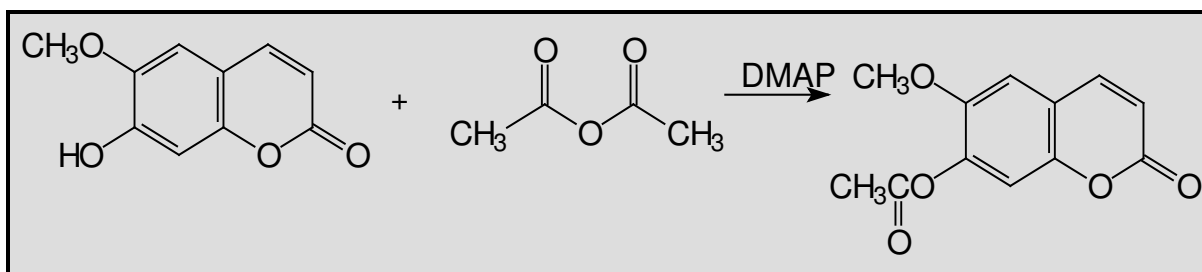
relação ao total de entradas multiplicado por 100. A redução desta razão, e daquela relativa ao tempo nos braços abertos, reflete o nível de medo ou ansiedade.

## 5.0 TRANSFORMAÇÕES ESTRUTURAIS EM COUMARINAS

### 5.1 Acetilação

O termo genérico "acilação" refere-se as reações que resultam na introdução de um grupo acila em um composto orgânico. O anidrido acético é o reagente mais utilizado nas reações de laboratório para a introdução de um grupo acetil.

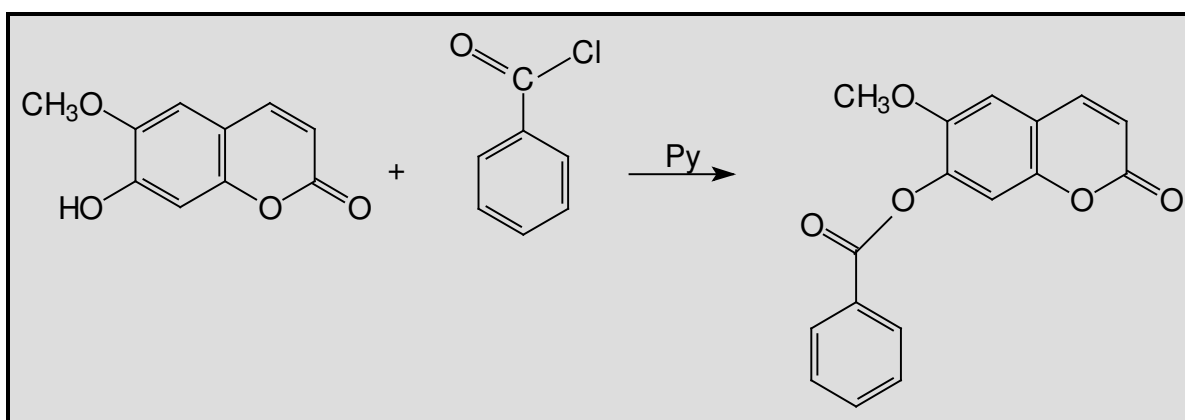
Foi utilizado 40mg de escopoletina e dissolvida em 5mL de acetato de etila à quente e adicionado, com agitação, 1,5mL de anidrido acético e uma quantidade catalítica de dimetilaminopiridina. A reação foi monitorada por CCD verificando-se que a reação ocorreu completamente após 40 minutos a temperatura ambiente. À mistura reacional foi adicionada etanol e evaporada em rotavapor até a completa remoção dos solventes, como o anidrido e o ácido acético que se forma na reação. O resíduo obtido foi suspenso em acetato de etila e purificado em coluna de sílica gel. Esta reação proporcionou bons rendimentos quando feito em piridina como solvente ou utilizando DMAP como catalisador. A reação de acetilação é:



## 5.2 Benzoilação

A benzoilação consiste na introdução de um grupo benzoíla em um composto orgânico. Para a benzoilação foi utilizado 60mg de escopoletina, sendo dissolvido em 1,5mL de piridina e adicionado 0,05mL de cloreto de benzoíla, sob agitação e à temperatura ambiente com monitoramento por CCD. Em 5 minutos todo o composto havia reagido.

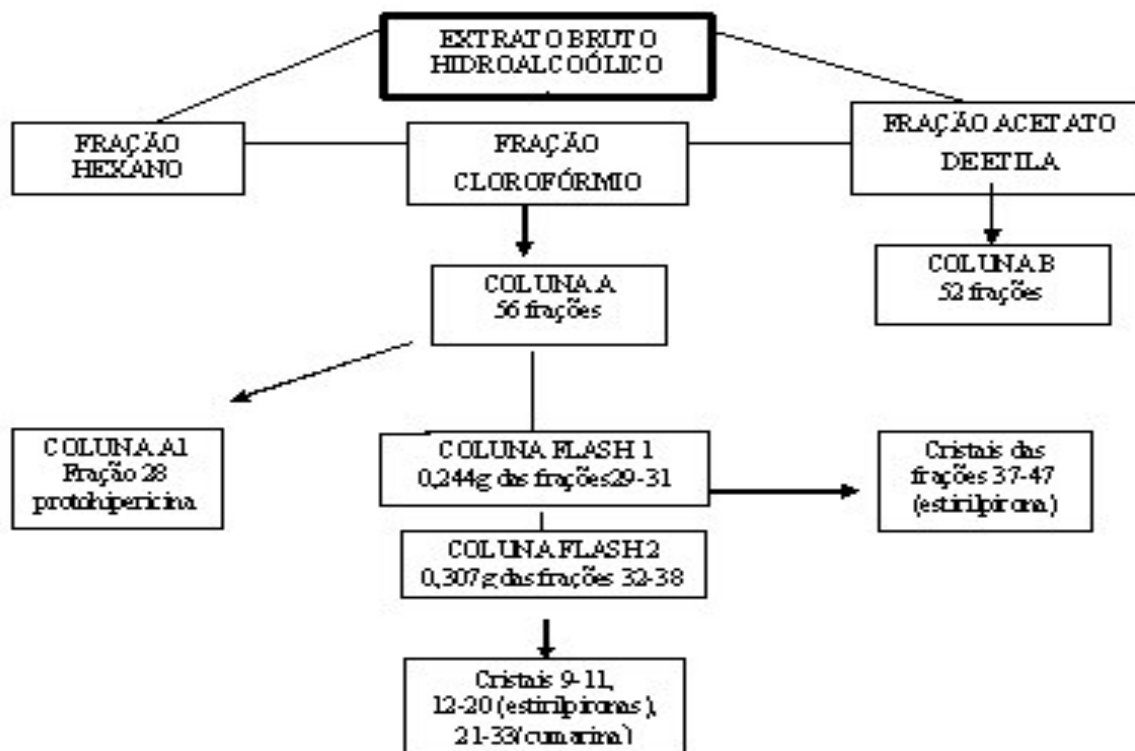
A mistura reacional foi tratada com etanol e evaporada em rotavapor até que todo o solvente tenha sido removido para purificação em coluna de sílica gel. A reação de benzoilação é:



## 6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto hidroalcoólico foi fracionado como mostra o fluxograma apresentado no esquema I.

**Esquema I – Fluxograma de fracionamento de *P. sabulosa***



O fracionamento da fração acetato de etila (coluna B), após análises realizadas por CCD, observou-se que todas as frações apresentavam uma composição bastante complexa e como estas frações apresentaram pouca massa, reservamos este material para estudos posteriores, pois a purificação de algum composto se tornaria bastante difícil.

O fracionamento cromatográfico da fração clorofórmica (coluna A) resultou em 56 frações que foram reunidas sob orientação das análises por CCD. As frações de 37-47 foram reunidas e recromatografadas em uma coluna Flash (Flash 1). Como resultado deste fracionamento obtivemos as frações que apresentaram material sólido que após a

purificação por recristalização em acetona obtivemos 76,6 mg de uma mistura constituída das dihidroestirilpironas 2 e 3. Estes compostos foram identificados através dos seus espectros de IV e RMN por comparação com dados descritos na literatura conforme tabela 1. O espectro de RMN de  $H^1$  (figura 5) nos mostra a presença de dois grupos de sinais em 2,8 e 2,6 ppm referente à ponte etilênica caracterizada de dihidroestirilpirona; em 3,95 ppm temos o 10-metóxi da dihidroestiril 3; em 3,78ppm são as duas metóxi em C4 das dihidroestiril 2 e 3; em 3,74ppm é o 14-metóxi da dihidroestiril 2; em 3,7 ppm a 14-metóxi da dihidroestiril 3. O  $H_3$  das dihidroestiril 2 e 3 aparecem em 5,4 ppm ; o H-5 das estiril 2 e 3 aparecem em 5,71ppm; H-10 de 2 em 6,59ppm;  $H_{13}$  de 2 em 6,49 ppm; H-13 de 3 em 6,22 ppm e o dióxi metileno de 2 em 5,88 ppm e de 3 em 5,85 ppm. A análise por CG desta mesma amostra apresentou 2 picos cromatográficos com tempos de retenção de 28,608min e 30,597min para o composto 2 e 3 respectivamente (figura 6). Estes valores foram comparados com os tempos de retenção dos padrões confirmando assim a identificação das dihidroestirilpironas 2 e 3 (figura 15).

As frações 32-38 da coluna A foram também recromatografadas em coluna Flash (Flash 2) o que resultou na obtenção de uma mistura das estirilpironas 2 e 5, que no CG ( figura 8) apresentaram tempos de retenção 28,981 min para a dihidroestiril 2 e 31,165 min para a estiril 5. O espectro de RMN de  $H^1$  (figura 7) nos mostra os sinais da ponte etilência da estirilpirona 2 em 2,8 e 2,65 ppm caracteriza a dihidroestirilpirona; em 3,74 ppm temos a 14-metóxi da estiril 2 ; em 3,77 ppm é o 4-metóxi de 2; em 5,48 ppm é o dióxido metileno de 5 e em 5,71 ppm o da estiril 2; em 6,36 ppm é o H7 da estiril 5; em 6,44 ppm o H13 da dihidroestiril 2; em 6,59 ppm H10 da dihidroestiril 2; em 6,81ppm o H14 da estiril 5; em 6,956 ppm H13 da estiril 5; em 7,01 ppm H10 da estiril 5; em 7,4 temos H8 da estiril 5.

As frações 21-33 foram purificadas por recristalização resultando no isolamento da cumarina escopoletina. Esta cumarina foi identificada através do espectro de próton (figura 9) da seguinte maneira: H3 está em 7,6 ppm dubleto, e está sob influência do cone de desproteção anisotrópica da carbonila; o H4 em 6,29 ppm dubleto ; H5 em 6,92 ppm (singleto) e H8 em 6,85 ppm (singleto) são os hidrogênios do anel aromático; o H do OH está em 6,19 ppm (singleto) e o H do metóxi em 3,95 ppm (singleto).

O espectro no Infra-Vermelho da escopoletina (figura 10) apresenta os picos de absorção em:  $3338\text{ cm}^{-1}$  que é o estiramento OH; em  $1703\text{ cm}^{-1}$  é da carbonila conjugada de lactona; em  $1566\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$  são C=C de aromático; em  $3024\text{ cm}^{-1}$  é C-H de aromático e  $2988$  e  $2944\text{ cm}^{-1}$  são as ligações  $\text{CH}_3$  de alifático.

A acetóxi escopoletina foi identificada pelo espectro de próton (figura 11) indicando que: o  $\text{CH}_3$  do grupo acetil está em 2,35 ppm (singleto) e o  $\text{CH}_3$  do metóxi está em 3,87 ppm (singleto); o H4 está em 6,40 ppm (dubleto); o H5 está em 7,65 ppm (dubleto); houve desaparecimento do sinal de H de OH em 6,19ppm; o H5 está em 6,97 ppm (singleto) pois está protegido pelo  $\text{CH}_3$  e o H8 está em 7,08 ppm (singleto). Para o espectro de  $\text{C}^{13}$  (figura 13) e DEPT (figura 14) os resultados foram os seguintes:

**Tabela 2** - Espectro de  $\text{C}^{13}$  (figura 13) e DEPT (figura 14) para a acetóxi escopoletina

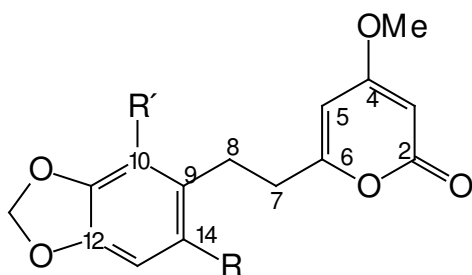
ppm	GRUPO	$\text{C}^{13}$	DEPT
2.35 s	$\text{CH}_3$ - acetil	20,53	$\text{CH}_3$
3.87 s	$\text{CH}_3$ -metoxi	56.32	$\text{CH}_3$
6.40 d	H4	142.81	CH
7.65 d	H3	116.38	CH
6.97 d	H5	1192	CH
7.08 s	H8	109.30	CH
-	-	116.82	C10
-	-	148.36	C6-C7-C9
-	-	160.57	C=O do acetil
-	-	168.32	C=O da lactona

Para o espectro de Infra-Vermelho (figura 12) da benzoiloxi escopoletina temos o desaparecimento da banda de estiramento OH; em  $3050\text{ cm}^{-1}$  temos os H do anel aromático; em  $2973\text{-}2938\text{ cm}^{-1}$  os estiramentos C-H alifático; em 1729 temos carbonila de éster sendo que o estiramento de carbonila da lactona está encoberta e em  $1565\text{-}1503\text{-}1455\text{ cm}^{-1}$  estiramento C=C do anel aromático. A figura 15 mostra o cromatograma do extrato bruto clorofórmico com a mistura dos padrões de estiril e dihidroestirilpironas.

Todos os resultados para o RMN de  $H^1$  para as estilil e dihidroestirilpironas foram comparados com os dados da Tabela 3.

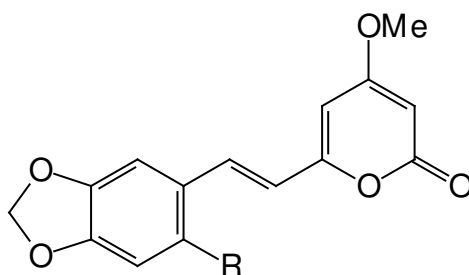
**Tabela 3:** Espectros de RMN  $H^1$  para os compostos de 1-4 <sup>(1)</sup>

H	1	2	3	4
3	5.41d(2.2)	5.41d(2.2)	5.41d(2.2)	5.46d(2.2)
5	5.72 d(2.2)	5.72d(2.2)	5.72d(2.2)	5.89d(2.2)
7	2.71t(7.6)	2.66t(7.6)	2.58t(7.6)	6.45d(16.1)
8	2.90t(7.6)	2.86t(7.6)	2.90t(7.6)	7.76d(16.1)
10	6.83d(2.0)	6.60s		6.98s
13	6.75d(8.0)	6.50s	6.22s	6.53s
14 6	68dd(8.0;2.0)			
4-Ome	3.85s	3.78s	3.78s	3.83s
10-Ome			3.96s	
14-Ome		3.75s	3.71s	3.84s
OCH2O	5.95s	5.89s	5.86s	5.96s



dihidroestirilpironas

	R	R'
1	H	H
2	OMe	H
3	OMe	OMe



estirilpironas

	R
4	OMe
5	H

## 6.1 BIOENSAIO DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

O extrato bruto de *P. sabulosa* foi avaliado quanto à atividade ansiolítica no modelo do labirinto em braço aberto. O tratamento por via intra-gástrica com o EB de *P. sabulosa* promoveu um efeito do tipo ansiolítico na dose de 500mg/Kg, no modelo em cruz elevado (LCE), com um efeito similar ao apresentado pelos animais tratados com diazepam 0,75mg/Kg i.p. quando comparados com o grupo controle. Além disso, promoveu efeito sedativo nas três doses utilizadas (250, 500 e 1000mg/Kg) caracterizado pelo aumento na duração do sono induzido por barbitúrico. Observou-se também a potencialização do sono induzido por éter na dose de 500mg/Kg.

## 7.0 CONCLUSÃO

O reisolamento e caracterização dos compostos da espécie *P. sabulosa* nos mostra que os componentes majoritários são as dihidroestirilpironas 2 e 3. Com sucessivas colunas de fracionamento isolou-se também uma cumarina, a escopoletina, sendo esta inédita para a espécie. As estilipironas são os compostos responsáveis pela atividade ansiolítica, já que os mesmos possuem estrutura semelhante às kavalactonas, que são os princípios ativos de Kava-Kava, uma planta originária das ilhas do Pacífico Sul que apresentam reconhecida atividade ansiolítica e é comercializada como fitoterápico. A protohipericina é o constituinte ativo do Hipérico, que é também uma reconhecida planta de atividade ansiolítica, sendo também já comercializada como fitoterápico. A presença de protohipericina e estilipironas de *P. sabulosa* cojuga a associação de duas importantes classes de substâncias de grande potencial na atividade a nível de SNC.

Para o estudo biológico do extrato bruto de *P. sabulosa*, foram avaliados atividade ansiolítica e antidepressiva em camundongos. Os resultados indicam que esta espécie vegetal apresenta um potencial efeito ansiolítico e antidepressivo, sendo que, com estudos mais avançados esta planta poderá ser colocada no rol das plantas usadas na fitoterapia.

Estas observações colocam esta espécie numa importante posição de plantas nativas com grande potencial no ramo da fitoterapia e que poderá agregar valores comerciais a esta espécie vegetal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PIZZOLATTI, M. G., LUCIANO C., DELLE MONACHE, F. **Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa***, *Phytochemistry*, Volume 55, Issue 7, December 2000, p. 819-822
2. BASTOS, J., PEREIRA, W. S., JUNIOR, A. C., MONACHE, F. D., PIZZOLATTI, M. G. **Identificação de uma nova Stilil-Lactona de *Polygala Sabulosa* (POLYGALACEAE) e seu significado quimiotaxonômico**. Resumo SBQ-Nacional, 2003 p.
3. RAO, M. S. , RAO, P. S., KUMAR J. K., RAMAN, N. V. Md. Khalilullah **A rare flavonol glycoside from *Polygala chinensis***, *Biochemical Systematics and Ecology*, Volume 31, Issue 6, June 2003, p. 635-636
4. JIANG, Y., TU, Peng-Fei - **Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia***, *Phytochemistry*, Volume 60, Issue 8, August 2002, p. 813-816
5. NAGAI, T., SUZUKI, Y., KIYOHARA, H., SUSA, E., KATO, T., NAGAMINE, T., HAGIWARA, Y., TAMURA, Shin-ichi, YABE, T., AIZAWA, C. and YAMADA, H.. - **Onjisaponins, from the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as effective adjuvants for nasal influenza and diphtheria-pertussis-tetanus vaccines**, *Vaccine*, Volume 19, Issue 32, 14 September 2001, p. 4824-4834
6. ESTRADA, A., KATSELIS, G. S., LAARVELD, B. and BARL, B. **Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L.**, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volume 23, Issue 1, January 2000, p. 27-43
7. LI, W., CHAN, Chi-Leung , LEUNG, Hi-Wun, YEUNG, Hin-Wing and XIAO, P. - **Xanthones from *Polygala caudata***, *Phytochemistry*, Volume 51, Issue 7, August 1999, p. 953-958
8. KIM, H. M. , LEE, E. H., NA, H. J., LEE, S. B., SHIN, T. Y., LYU, Y. S., KIM, N. S. and NOMURA, S. - **Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor- secretion from mouse astrocytes**, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 61, Issue 3, July 1998, p. 201-208
9. PINHEIRO, T. R., FILHO, C. V., SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B., DELLE MONACHE, F., PIZZOLATTI, M. G., YUNES, R. A. - **Three xanthones from *Polygala cyparissias***, *Phytochemistry*, Volume 48, Issue 4, June 1998, p. 725-728

10. **Polygalasaponins XLII-XLVI from roots of *Polygala glomerata***, Phytochemistry, Volume 47, Issue 3, February 1998, p. 459-466  
Zhang Dongming, Toshio Miyase, Masanori Kuroyanagi, Kaoru Umehara and Hiroshi Noguchi
11. CAMPOS, R. O. P., SANTOS, A. R. S., VAZ, Z. R., PINHEIRO, T. R., PIZZOLATTI, M. G., FILHO, V. C., DELLE MONACHE, F., YUNES, R. A. and CALIXTO, J. B. - **Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae)**, Life Sciences, Volume 61, Issue 16, 12 September 1997, p.1619-1630
12. ZHANG, D., MIYASE, T., KUROYANAGI, M., UMEHARA, K. and NOGUCHI, H. - **Oligosaccharide polyesters from roots of *Polygala fallax***, Phytochemistry, Volume 45, Issue 4, June 1997, p. 733-741
13. JUNG, K., DO, J. C. and SON, K. H. **Kaempferol 3-O-[62"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl) glucoside] from leaves of *Polygala japonica***, Phytochemistry, Volume 34, Issue 4, November 1993, p. 1196-1197
14. BASHIR, A., HAMBURGER, M., MSONTHI, J. D. and HOSTETTMANN, K. - **Sinapic acid esters from *Polygala virgata***, Phytochemistry, Volume 32, Issue 3, February 1993, p. 741-745
15. FUJITA, T., LIU, D.Y., UEDA, S., TAKEDA, Y. - **Xanthones from *Polygala tenuifolia***, Phytochemistry, Volume 31, Issue 11, 1992
16. BASHIR, A., HAMBURGER, M., MSONTHI, J. D. and HOSTETTMANN, K. - **Isoflavones and xanthones from *Polygala virgata***, Phytochemistry, Volume 31, Issue 1, January 1991, p. 309-311
17. HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. - **Hydroxycinnamic acid esters from *Polygala chamaebuxus***, Phytochemistry, Volume 24, Issue 8, 1985, p. 1793-1797
18. GHOSAL, S., BASUMATARI, P. C., BANERJEE, S. - **1,2,3-Trioxxygenated glucosyloxanthones from *Polygala triphylla***, Phytochemistry, Volume 20, Issue 3, 13 March 1981, p. 489-492
19. ITO, H., TANIGUCHI, H., KITA, T., MATSUKI, Y., TACHIKAWA, E., FUJITA, T. - **Xanthones and a cinnamic acid derivatives from *Polygala tenuifolia***, Phytochemistry, Volume 16, Issue 10, 1977, p. 1614-1616

20. GHOSAL, S., CHAUHAN, R. P. S., SRIVASTAVA, R. S. - **Structure of chinensin: A new lignan lactone from *Polygala chinensis***, Phytochemistry, Volume 13, Issue 10, October 1974, p. 2281-2284
21. GHOSAL, S., CHAUHAN, R. P. S., SRIVASTAVA, R. S. - **Two new aryl naphthalide lignans from *Polygala chinensis***, Phytochemistry, Volume 13, Issue 9, September 1974, p. 1933-1936
22. GHOSAL, S., KUMARSWAMY, C., CHAUHAN, R. B. S., SRIVASTAVA, R. S. - **Lactonic lignans of *Polygala chinensis***, Phytochemistry, Volume 12, Issue 10, October 1973, p. 2550-2551
23. CORNER, J. J., HARBORNE, J. B., HUMPHRIES, S. G. and OLLIS, W. D. - **Plant polyphenols. VII. The hydroxycinnamoyl esters of *Polygala senega* root**, Phytochemistry, Volume 1, Issue 2, April 1962, p. 73-77
24. SIMÕES, M. L. C., et al – **Farmacognosia: da planta ao medicamento**- 2<sup>a</sup> ed. rev.- Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000.
25. RANG, H. P; RITTER, J. M; DALE, M. M. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2001. 703p. ISBN 8527706091
26. [http://www.google.com/search?q=cache:fefDSWabekJ:www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/A03kawakawa.html+kawa-kawa&hl=pt-BR&lr=lang\\_pt&ie=UTF-8](http://www.google.com/search?q=cache:fefDSWabekJ:www.jardimdeflores.com.br/ERVAS/A03kawakawa.html+kawa-kawa&hl=pt-BR&lr=lang_pt&ie=UTF-8)
27. a) BLÁZQUEZ, M. A., BERMEJO, A., ZAFRA-POLO, M. C., CORTES, D. **Styryl-lactones from *Goniothalamus species*** – A review. Phytochemical Analysis, v. 10, p. 161-170, 1999. b) BERMEJO, A., BLÁZQUEZ, M. A., RAO K. S., CORTES, D. **Styryl-lactones from the stem bark of *Goniothalamus arvensis***. Phytochemical Analysis, v. 10, p. 127-131, 1999.
28. PIZZOLATTI, M. G., KOGA, A. H., GRISARD, E. C., STEINDEL, M. – **Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species**- Phytomedicine, v.9, p. 422-426, 2002.
29. JUNIOR, A. C. – **Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A. W. Bennet (POLYGALACEAE): Isolamento e Atividade biológica**. Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 2002.

# ANEXOS

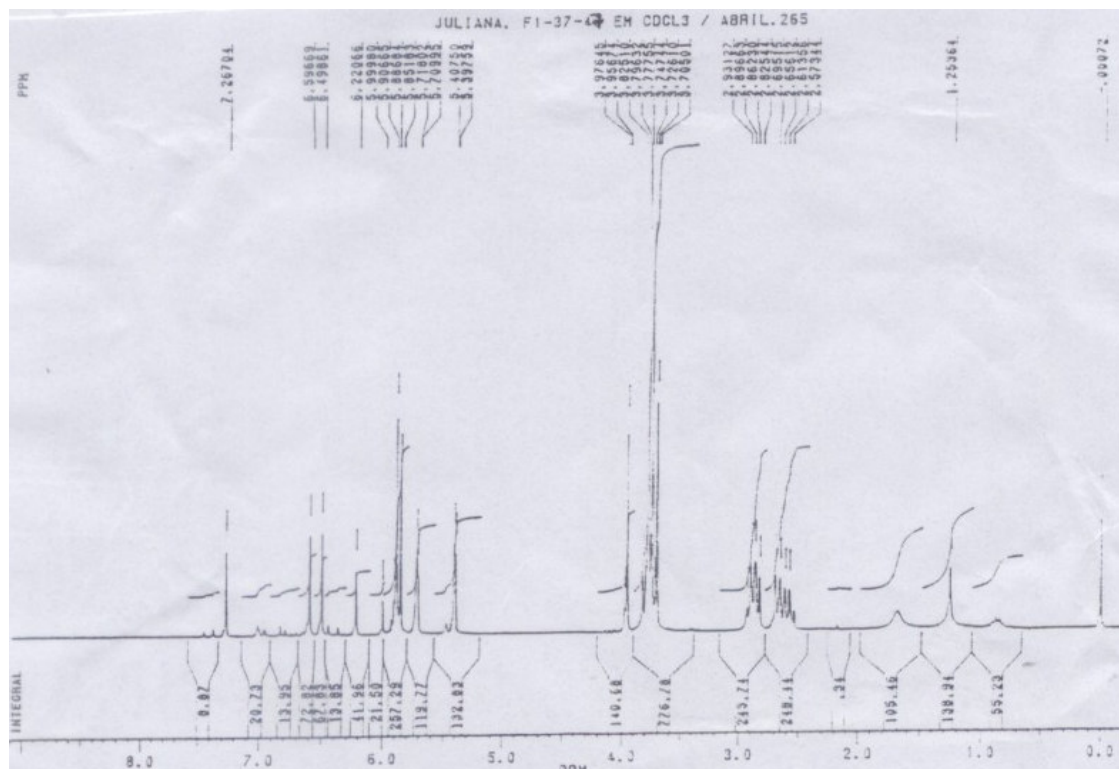


Figura 5 - Espectro de RMN de  $H^1$  da fração F1 37-47 contendo mistura das dihidroestirilpironas 2 e 3.

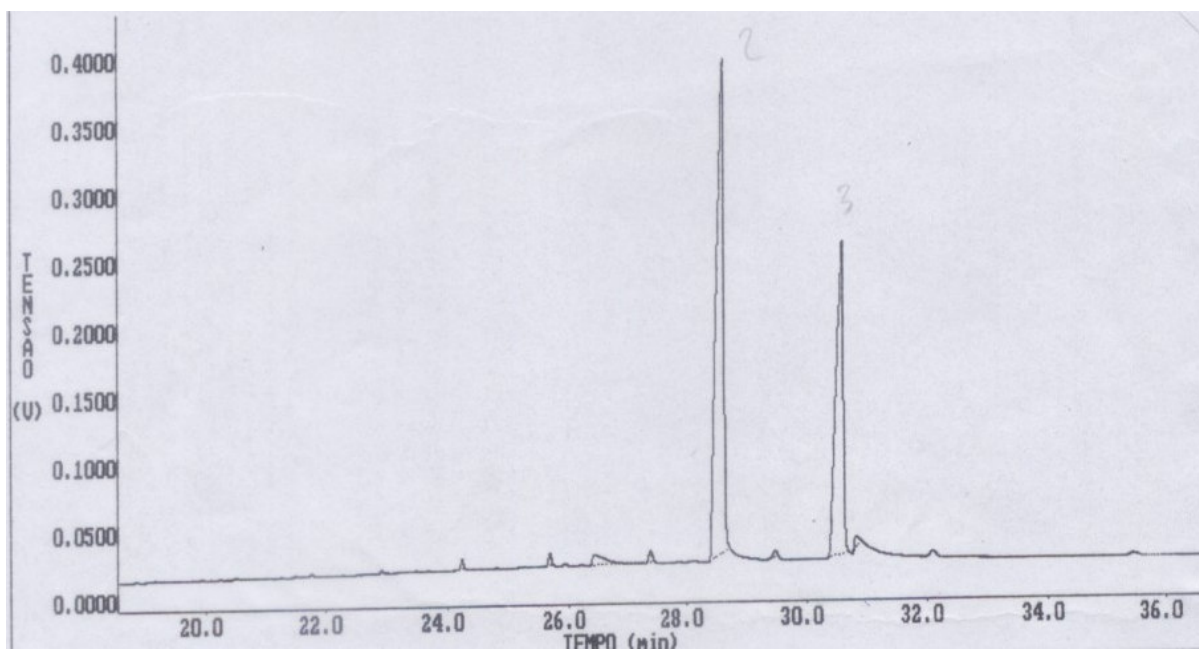


Figura 6- Cromatograma CGAR da fração F! 37-47 contendo misturas das dihidroestirilpironas 2 e 3.

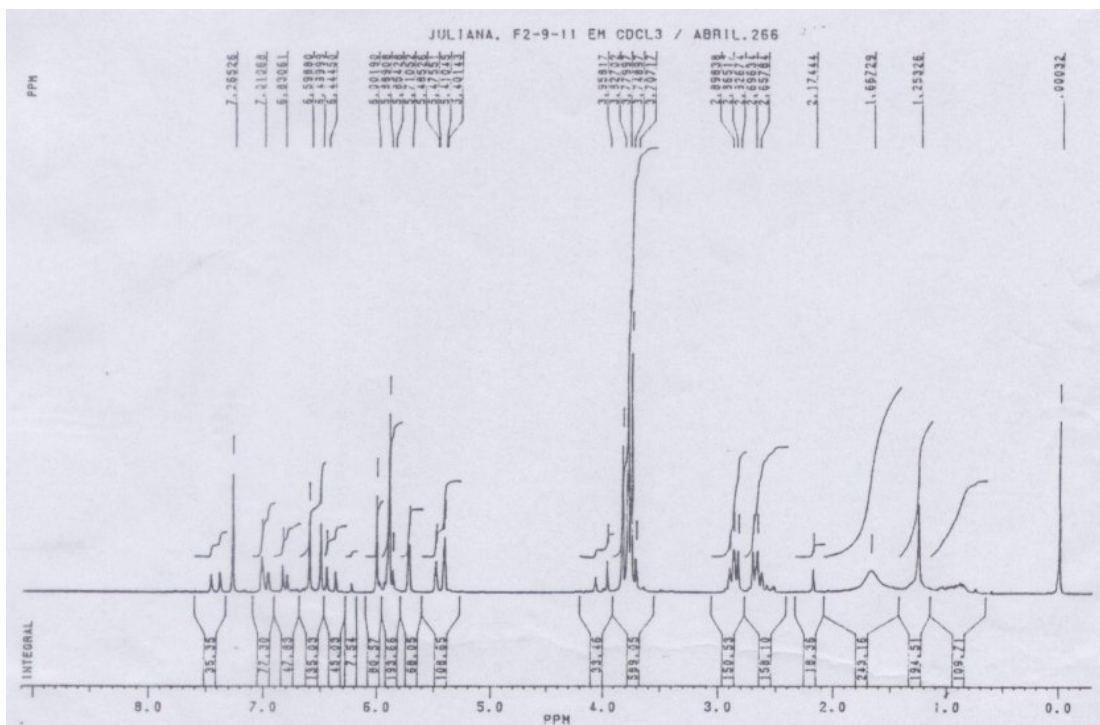


Figura 7 – Espectro de RMN de  $H^1$  da fração F2 9-11 contendo misturas das estirilpironas 2 e 5.

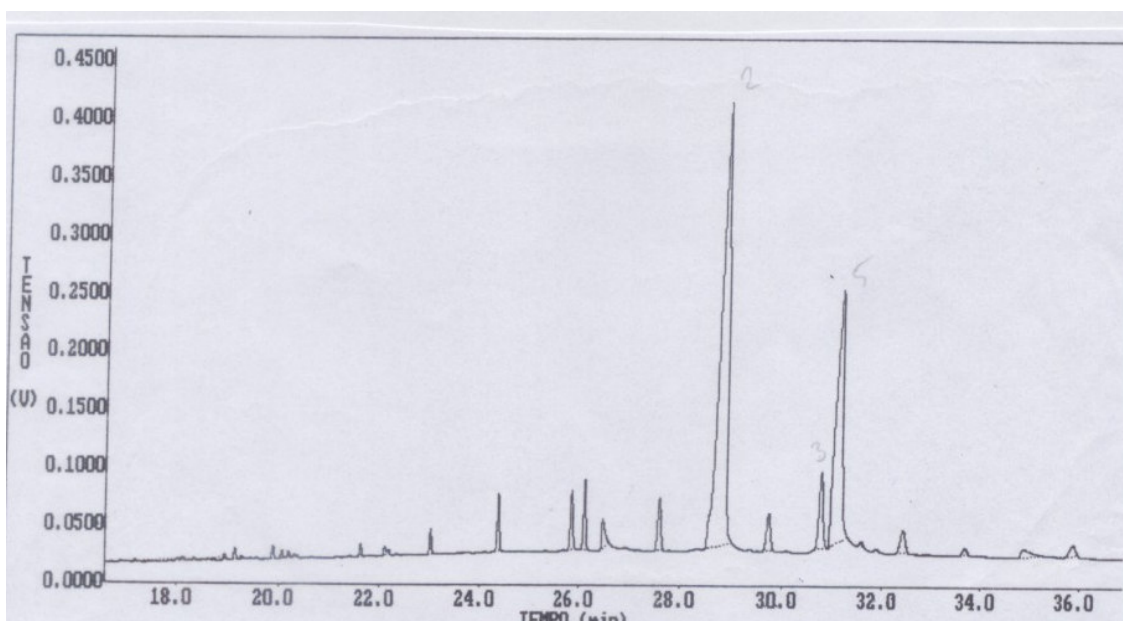


Figura 8 – Cromatograma CGAR da fração F2 9-11 contendo misturas das estirilpironas 2 e 5.

IR Spectrum (cm⁻¹ vs %T) for compound 1. Key peaks are labeled with their wavenumbers:

- 3438.37
- 3024.34
- 2988.63
- 2944.98
- 1711.22
- 1609.80
- 1566.61
- 1510.75
- 1438.71
- 1378.32
- 1294.18
- 1268.68
- 1220.96
- 1193.70
- 1140.45
- 1099.19
- 1016.45
- 920.95
- 860.73
- 819.11
- 748.08
- 663.75
- 500.30
- 444.3

Figura 10 – Espectro de IV da escopoletina



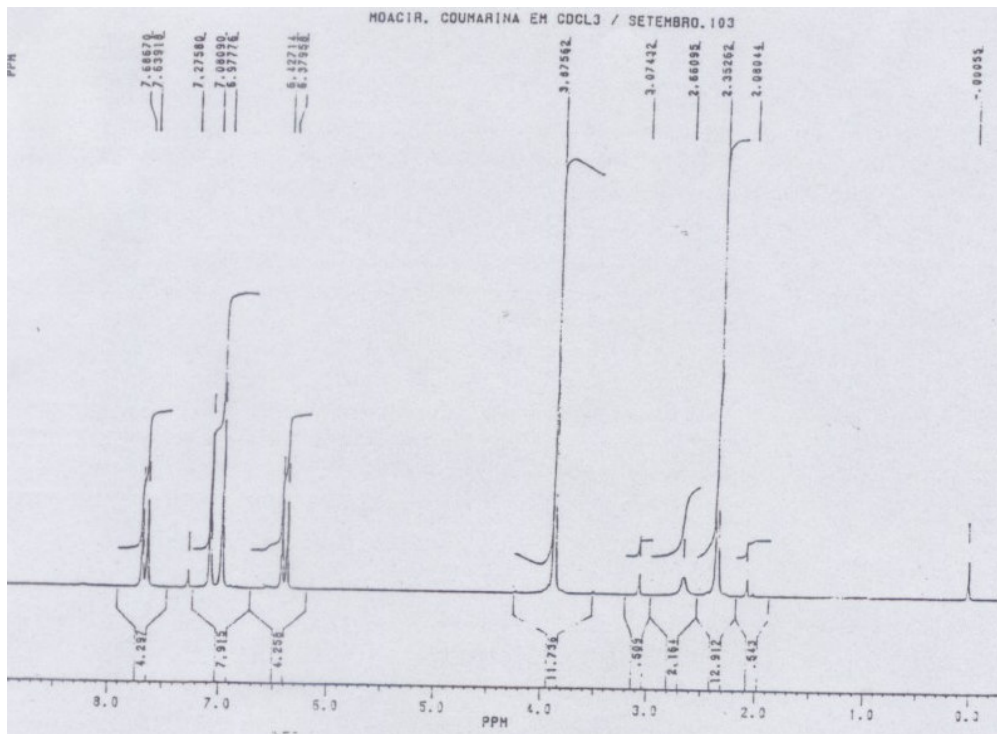


Figura 11- Espectro de RMN de H<sup>1</sup> da acetóxi escopoletina

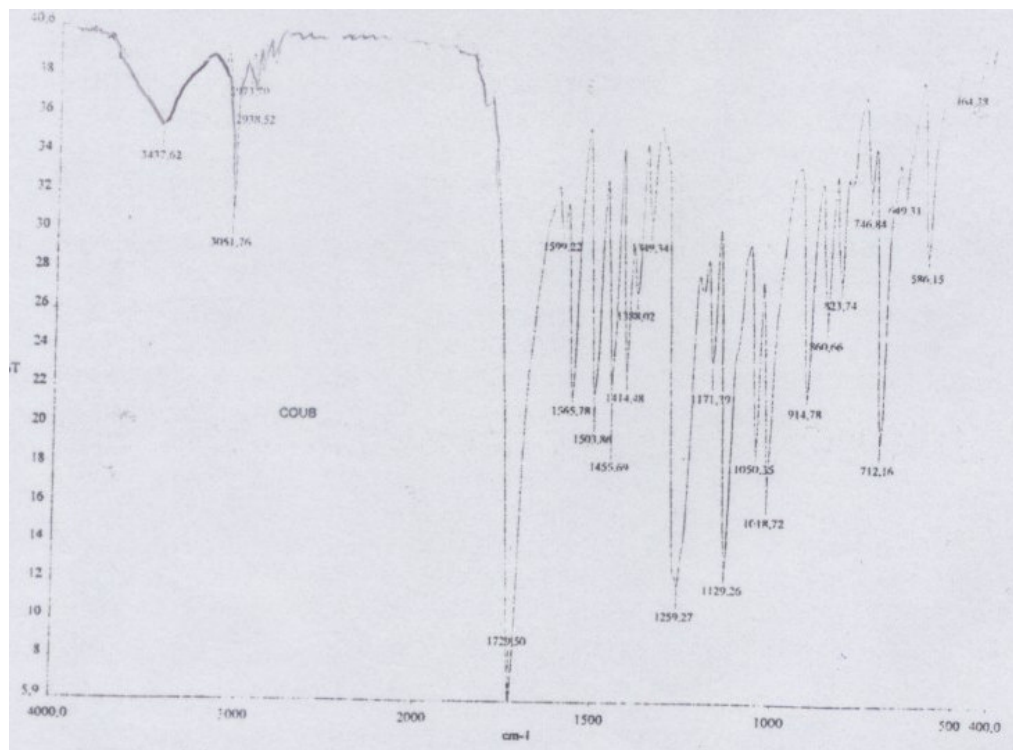


Figura 12 – Espectro de IV da benzilóxi escopoletina



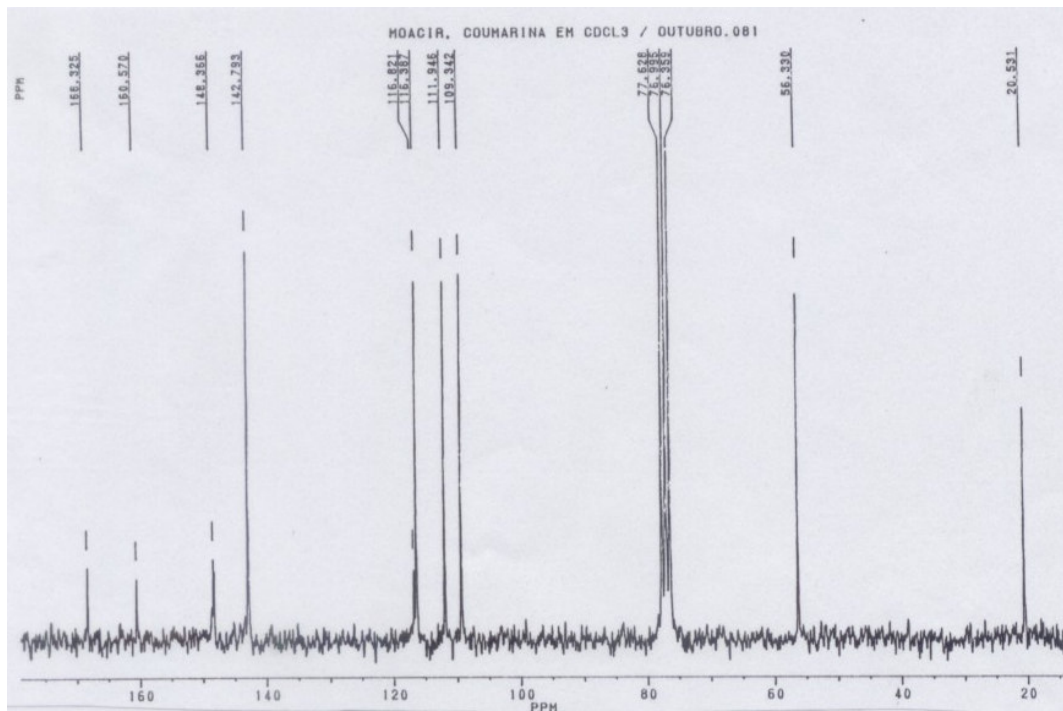


Figura 13 – Espectro de RMN de  $C^{13}$  da acetóxi escopoletina

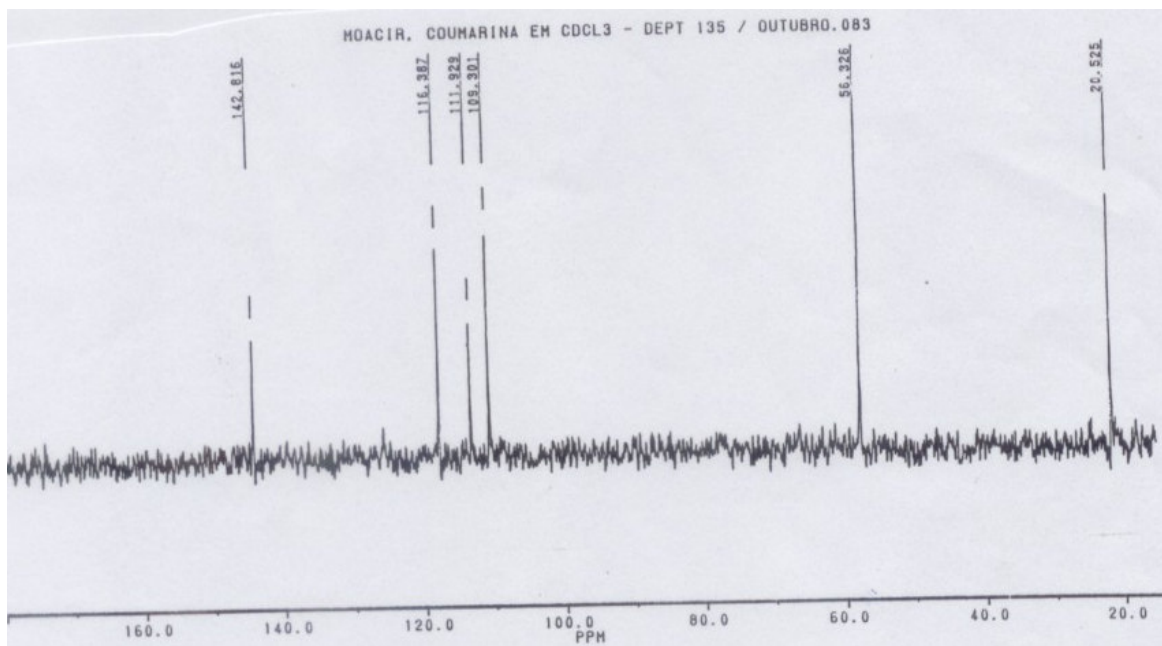


Figura 14 – DEPT da acetóxi escopoletina

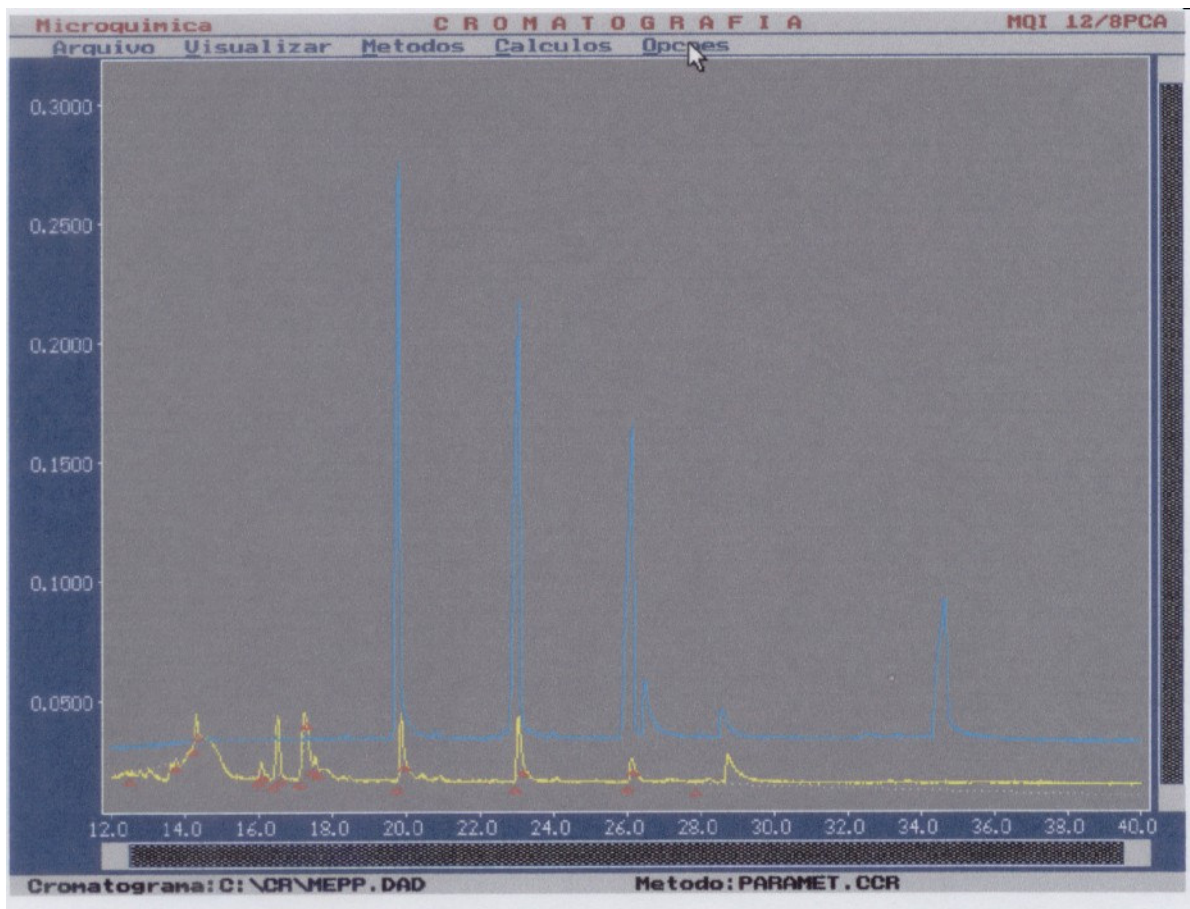


Figura 15- azul- mistura padrão de estiril e dihidroetirilpironas  
Amarelo – extrato bruto clorofórmico de *P. sabulosa*